

三十六荡坎蛤散对 HMGB1 诱导 BEAS-2B 细胞炎症的抑制作用

杨丽琴¹, 吴玉苗¹, 李伟伟^{2*}

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023)

摘要: **目的** 探讨三十六荡坎蛤散调控 BEAS-2B 细胞炎症反应的机制。**方法** 使用 BEAS-2B 细胞构建体外炎症模型。CCK-8 法筛选适宜条件的三十六荡坎蛤散含药血清浓度及 HMGB1 造模浓度, 将细胞分为对照组、模型组和三十六荡坎蛤散低、中、高剂量组 (5%、10%、20%)。ELISA 法检测细胞上清液 IL-6、IL-10 水平, 确定三十六荡坎蛤散含药血清的最佳干预剂量后继续分组处理。将细胞分为对照组、模型组、三十六荡坎蛤散组、TAK-242 组、三十六荡坎蛤散+TAK-242 组。CCK-8 法检测细胞存活率; 流式细胞术检测细胞凋亡率; ELISA 法检测细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、HMGB1、NF- κ B 水平; RT-qPCR 法检测 *HMGB1*、*TLR4*、*MyD88*、*NF- κ B p65* mRNA 表达; Western blot 法检测 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 三十六荡坎蛤散各剂量组细胞上清液 IL-10 水平升高 ($P<0.01$), IL-6 水平降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组细胞存活率升高 ($P<0.01$), 细胞凋亡率降低 ($P<0.01$), IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、HMGB1、NF- κ B 水平降低 ($P<0.01$), *HMGB1*、*TLR4*、*MyD88*、*NF- κ B p65* mRNA 表达降低 ($P<0.01$), TLR4、MyD88 蛋白表达、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 磷酸化水平降低 ($P<0.01$), 以三十六荡坎蛤散+TAK-242 组更显著。**结论** 三十六荡坎蛤散可能通过下调 HMGB1/TLR4/MyD88 信号通路抑制细胞炎症因子的释放, 达到改善气道炎症的作用。

关键词: 三十六荡坎蛤散; 支气管哮喘; 炎症; HMGB1; TLR4/MyD88 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)12-4151-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.041

支气管哮喘, 简称哮喘, 是儿科临床常见和多发的慢性气道炎症性疾病之一^[1]。近年来, 儿童哮喘患病率呈逐年增长趋势, 依据全国第 7 次人口普查数据估算, 0~14 岁哮喘患儿可达 810 余万, 部分哮喘患儿反复发作甚至迁延至成人期, 给社会和家庭带来巨大的经济和精神负担^[2-3]。哮喘缓解期是非常重要的治疗期, 是预防患儿在哮喘急性发作严重转为儿科危重症的重要阶段, 因此如何维持哮喘缓解期的长期稳定是防治儿童哮喘的重要问题。

诸多研究表明中医药在防治哮喘缓解期方面具有独特优势^[4-5]。壮医药作为中医药重要组成部分, 治疗哮喘有着其独特的理论体系, 认为哮喘缓解期的治疗主要以“调气补虚化痰”为主^[6], 三十六荡坎蛤散是其中的代表方剂, 具有扶正祛邪、调气解毒的作用^[7]。本实验通过高速泳动簇蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 诱导 BEAS-2B 细胞构建体外哮喘模型, 探讨三十六荡坎蛤散改善哮喘气道炎症的分子机制, 以期对三十六荡坎蛤散的

临床应用和推广提供基础研究支持。

1 材料

1.1 动物及细胞 11 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体重 (350 $\pm$ 50) g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004]。在室温 23~26 $^{\circ}$ C、相对湿度 40%~70% 条件下自由摄食和饮水的环境中饲养 1 周, 饲养于广西中医药大学科学实验中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (桂) 2019-0001]。本实验经广西中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理号 DW20220625-239)。人支气管上皮细胞 BEAS-2B 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药物 三十六荡坎蛤散由三十六荡 5 g、一匹绸 30 g、蛤蚧 20 g、石蚂蟥 10 g、龙脷叶 20 g、坎气 15 g 组成, 购于广西中医药大学第一附属医院, 经药剂中心谢广源副主任医师鉴定为正品。取 10 倍量水浸泡所有药材 30 min, 煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并煎液, 过滤, 浓缩至生药量 2.182 g/mL, 分装密封, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

收稿日期: 2024-07-19

基金项目: 国家自然科学基金 (81860867); 广西自然科学基金 (2018JJA140356); 广西壮族自治区中医药管理局自筹科研课题 (GXZYA20240220); 广西中医药大学博士科研启动基金 (2023BS008); 广西中医药大学校级科研项目 (2022MS011)

作者简介: 杨丽琴 (1983—), 女, 博士, 讲师, 从事儿科肺肾系疾病与体质、免疫相关研究。Tel: 18007805191, E-mail: 271783227@qq.com

***通信作者:** 李伟伟 (1965—), 男, 主任医师, 从事儿科肺肾系疾病与体质、免疫相关研究。Tel: 13878161612, E-mail: 13878161612@163.com

1.3 试剂 BEAS-2B 细胞专用培养基（武汉普诺赛生命科技有限公司，批号 CM-0496）；胎牛血清（美国 Gibco 公司，批号 10270-106）；PBS、0.25% 胰蛋白酶、CCK8 细胞增殖检测试剂盒、10 mmol/L dNTP Mix、DNase/RNase-Free Water、十二烷基硫酸钠（SDS）、TEMED、过硫酸铵、Tween-20、RIPA（强）组织细胞快速裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，批号 P1010、T1350、CA1210、PC2200、R1600、S8010、T8090、A1030-1、T8220-100、R0010、PC0020）；人重组 NF- κ B 酶联免疫分析（ELISA）试剂盒、人重组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、NF- κ B、HMGB1 抗体、兔源 TLR4 多克隆抗体、兔源 MyD88 多克隆抗体、兔源 NF- κ B p65（RELA）多克隆抗体、兔源 GAPDH 多克隆抗体、山羊抗兔免疫球蛋白（Goat anti-Rabbit IgG 二抗）（武汉贝茵莱生物科技有限公司，批号 HM10008、HM10001、HM10206、HM10205、HM10203、HM10008、HM10235、PAB47910、PAB47936、PAB45935、PAB36269、SAB43714）；Oligo（dT）18 Primer、PrimeScript II RTase、TAK-242（日本 TaKaRa 公司，批号 3806、2690A、2313A）；人重组 HMGB1（美国 MedChemExpress 公司，批号 HY-P70570）；AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒（美国 BD 公司，批号 556547）；TRIzol（美国 Ambion 公司，批号 15596026）；SYBR FAST qPCR Master Mix（美国 KAPA Biosystems 公司，批号 KM4101）；蛋白质 Marker（德国 Helix 公司，批号 P12103）；PVDF 转移膜、化学发光试剂（德国 Merck 公司，批号 IPVH00010、WBKLS0500）；兔源 Anti-NF- κ B p65（phospho S536）多克隆抗体（英国 Abcam 公司，批号 ab76302）。氯仿、异丙醇、无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司，批号 10006818、80109218、10009218）。

1.4 仪器 超净工作台（苏州智净净化设备有限公司）；生物安全柜（德国 Spantech 公司）；CO₂ 恒温培养箱、移液器（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；酶标仪、酶标洗板机、高速冷冻离心机（杭州奥盛仪器有限公司）；倒置荧光显微镜、水浴锅（德国 Leica 公司）；高压灭菌锅（上海三申医疗器械有限公司）；微量移液枪（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；PCR 仪（杭州柏恒科技有限公司）；荧光定量 PCR 仪、电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；数显恒温水浴锅（常州金南仪器制造有限公司）；干式恒温器（杭州爽盛仪器有限公司）；全自动化学发光分析仪（上海天能生命科学有限公司）；UPT 优普特实验室超纯水器（德国 Merck 公司）。

2 方法

2.1 细胞培养、传代 将 BEAS-2B 细胞培养在含有 10% 胎牛血清（FBS）和 1% 青链霉素混合液的 DMEM 培养液，置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中，待贴壁生长至约培养瓶的 80%~90% 时进行传代。

2.2 三十六荡坎蛤散含药血清的干预时间和给药浓度的筛选 取对数生长期的 BEAS-2B 细胞以 3×10³/孔的密度接种

于 96 孔板中，培养 24 h，分别加入 5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60% 大鼠空白血清和大鼠含药血清各 100 μ L，同时设置调零组（只加培养基不加细胞）、正常组（加培养基和细胞，但不加大鼠血清），分别继续培养 12、24、48 h。之后取出细胞培养板，向每孔加入 10 μ L CCK8 溶液，继续培养 4 h，在酶联免疫检测仪 450 nm 波长处检测吸光度（A），计算细胞存活率。

2.3 体外哮喘细胞模型的构建和造模浓度的筛选 用 HMGB1 诱导 BEAS-2B 细胞构建体外哮喘模型^[8]，ELISA 法检测诱导后细胞上清液 NF- κ B 水平，确定 HMGB1 造模浓度。结果显示，干预 BEAS-2B 细胞最佳时间为 24 h，HMGB1 最佳质量浓度为 80 ng/mL。

2.4 ELISA 法检测细胞上清液 IL-6、IL-10 水平 将细胞分为对照组、模型组和三十六荡坎蛤散低、中、高剂量组（5%、10%、20%）。造模后分别给予相应药物处理，收集各组细胞，严格按照试剂盒说明书步骤操作，检测细胞上清液 IL-6、IL-10 水平。

2.5 流式细胞术检测三十六荡坎蛤散对 BEAS-2B 细胞凋亡率的影响 将细胞分为对照组、模型组、三十六荡坎蛤散组、TAK-242 组、三十六荡坎蛤散+TAK-242 组。造模后分别给药处理，收集各组细胞，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清；将细胞重悬于 200 μ L PBS；再加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI，轻轻混匀，4℃下避光孵育 30 min；再加入 300 μ L PBS，上机检测。

2.6 ELISA 法检测细胞上清液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、HMGB1、NF- κ B 水平 细胞分组处理同“2.6”，收集各组细胞，严格按照试剂盒说明书步骤操作，检测细胞上清液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、HMGB1、NF- κ B 水平。

2.7 RT-qPCR 检测细胞 HMGB1、TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达 细胞分组处理同“2.6”，收集各组细胞，用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA，检测总 RNA 浓度，按照反转录试剂盒进行逆转录反应，qPCR 试剂盒进行扩增反应，引物序列见表 1，反应条件为 95℃预变性 3 min，95℃变性 5 s，56℃退火 10 s，延伸 30 s，共 40 个循环，以 β -actin 为内参，使用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法进行相对定量分析。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')
MyD88	正向 AGTGTCTGGGGGAGGAATGA
	反向 ACACTTGACCCAGGTGCTT
HMGB1	正向 AGGAGTGGCTTTTGTCCCTC
	反向 AGAGCCCGCAGTTTCTATC
TLR4	正向 ACTGTTGCAGAAAATGCCAG
	反向 CATCAGGGACTTTGCTGAGTTTC
NF- κ B p65	正向 GCCTCTGGCGAATGCTTTA
	反向 TGCTTCGGCTGTTCGATGAT
β -actin	正向 CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT
	反向 TGGCATAGAGGCTCTTTACGG

2.8 Western blot 法检测细胞 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达 细胞分组处理同“2.6”，收集各

组细胞，在 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min，取上清，提取蛋白，BCA 法检测蛋白含量，取等质量蛋白进行变性，加入蛋白上样缓冲液后冷冻保存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% BSA 室温封闭 1 h，分别加入 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 抗体（1：1 000），4 ℃ 孵育过夜，次日加入二抗（1：1 000）室温孵育 1 h，使用全自动化学发光图像分析系统显影，以 GAPDH 为内参，通过 ImageJ 软件分析蛋白灰度值。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表 2 三十六荡坎蛤散含药血清对 BEAS-2B 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s$ ， $n=3$)

组别	含药血清体积分数/%	细胞存活率/%		
		12 h	24 h	48 h
空白血清组	5	0.971±0.016	0.952±0.008	0.984±0.016 *
	10	0.902±0.018	0.891±0.004	0.957±0.044
	15	0.902±0.029	0.885±0.002	0.934±0.033
	20	0.871±0.040	0.882±0.008	0.884±0.004
	30	0.841±0.028	0.833±0.026	0.802±0.008
	40	0.847±0.025	0.845±0.031	0.790±0.001
	50	0.846±0.007	0.851±0.033	0.785±0.003
	60	0.837±0.022	0.852±0.002	0.780±0.014
三十六荡坎蛤散含药血清组	5	0.884±0.007 *	0.856±0.017	0.768±0.010 **
	10	0.793±0.008	0.785±0.013	0.743±0.000 #
	15	0.782±0.004 $\Delta\Delta$	0.735±0.002	0.741±0.017
	20	0.763±0.030	0.718±0.007	0.726±0.019
	30	0.716±0.000	0.707±0.038	0.716±0.003
	40	0.714±0.012	0.662±0.014	0.661±0.004
	50	0.750±0.020	0.662±0.001	0.634±0.013
	60	0.724±0.013	0.690±0.035	0.627±0.009

注：与 24 h 的 5% 空白血清同体积对应比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 24 h 的 10% 含药血清同体积对应比较，# $P<0.05$ ；与 24 h 的 15% 含药血清同体积对应比较， $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

3.1.2 三十六荡坎蛤散对细胞上清液 IL-6、IL-10 水平的影响 与对照组比较，模型组细胞上清液 IL-10 水平降低 ($P<0.01$)，IL-6 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，三十六荡坎蛤散各剂量组细胞上清液 IL-10 水平升高

3 结果

3.1 三十六荡坎蛤散含药血清的最佳干预浓度及时间筛选结果

3.1.1 三十六荡坎蛤散含药血清对 BEAS-2B 细胞存活率的影响 相同体积分数含药血清的细胞存活率会随着干预时间的延长而下降，但总体来看 12、24 h 的细胞存活率相差不大；同体积分数空白血清的细胞存活率无统计学差异 ($P>0.05$)，综合考虑，选择 24 h 作为含药血清的最佳干预时间。随着体积分数增加，含药血清和空白血清的细胞存活率逐渐下降，故选取 5%、10%、15% 作为三十六荡坎蛤散含药血清低、中、高剂量组，选取 10% 空白大鼠血清进行后续实验，见表 2。

($P<0.01$)，IL-6 水平降低 ($P<0.01$)，以三十六荡坎蛤散中剂量组最显著 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)，因此后续实验以中剂量即 10% 为最佳，见表 3。

表 3 三十六荡坎蛤散对细胞上清液 IL-6、IL-10 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$ ， $n=3$)

组别	含药血清体积分数/%	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照组	—	129.593±1.442	43.519±7.209
模型组	—	51.449±3.275 **	148.915±4.696 **
三十六荡坎蛤散低剂量组	5	65.592±2.735 $^{##\Delta\Delta}$	107.062±2.855 $^{##\Delta\Delta}$
三十六荡坎蛤散中剂量组	10	93.434±3.545 $^{##}$	82.631±2.292 $^{##}$
三十六荡坎蛤散高剂量组	15	97.314±4.866 $^{##}$	73.827±3.998 $^{##\Delta}$

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较， $^{##}$ $P<0.01$ ；与三十六荡坎蛤散中剂量组比较， Δ $P<0.05$ ， $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

3.2 三十六荡坎蛤散对 BEAS-2B 细胞存活率的影响 与对照组比较，模型组细胞存活率降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，三十六荡坎蛤散组、TAK-242 组、三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞存活率升高 ($P<0.01$)；与 TAK-242 组比较，三十六荡坎蛤散组细胞存活率降低 ($P<0.01$)，三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞存活率升高 ($P<0.01$)，见表 4。

3.3 三十六荡坎蛤散对 BEAS-2B 细胞凋亡率的影响 与对照组比较，模型组细胞凋亡率升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，三十六荡坎蛤散组、TAK-242 组和三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞凋亡率降低 ($P<0.01$)；与 TAK-242 组比较，三十六荡坎蛤散组细胞凋亡率升高 ($P<0.01$)，三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞凋亡率降低 ($P<0.01$)，见表 5。

表 4 三十六荡坎蛤散对 BEAS-2B 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞存活率/%
对照组	0.858±0.004
模型组	0.657±0.015**
三十六荡坎蛤散组	0.737±0.016### $\Delta\Delta$
TAK-242 组	0.782±0.011###
三十六荡坎蛤散+TAK-242 组	0.849±0.018### $\Delta\Delta$

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，### $P<0.01$ ；与 TAK-242 组比较， $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

表 5 三十六荡坎蛤散对 BEAS-2B 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞凋亡率/%
对照组	0.082±0.033
模型组	0.228±0.005**
三十六荡坎蛤散组	0.206±0.004### $\Delta\Delta$
TAK-242 组	0.164±0.015###
三十六荡坎蛤散+TAK-242 组	0.131±0.002### $\Delta\Delta$

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，### $P<0.01$ ；与 TAK-242 组比较， $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

表 6 三十六荡坎蛤散对细胞上清液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照组	101.755±1.894	31.903±1.777	136.761±8.587
模型组	471.477±9.716**	211.006±4.425**	577.906±11.493**
三十六荡坎蛤散组	301.437±16.943### $\Delta\Delta$	117.390±1.612### Δ	297.114±4.753### $\Delta\Delta$
TAK-242 组	250.349±4.857###	111.290±4.182###	252.743±9.150###
三十六荡坎蛤散+TAK-242 组	227.559±8.326### Δ	79.488±3.492### $\Delta\Delta$	207.560±8.594### $\Delta\Delta$

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，### $P<0.01$ ；与 TAK-242 组比较， Δ $P<0.05$ ， $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

表 7 三十六荡坎蛤散对细胞上清液 HMGB1、NF- κ B 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	HMGB1/(ng·mL ⁻¹)	NF- κ B/(pg·mL ⁻¹)
对照组	71.132±6.416	1 103.166±28.251
模型组	306.135±14.060**	3 966.829±89.537**
三十六荡坎蛤散组	244.299±9.093### $\Delta\Delta$	2 715.664±100.172### $\Delta\Delta$
TAK-242 组	213.938±2.873###	2 077.860±58.866###
三十六荡坎蛤散+TAK-242 组	173.270±4.670### $\Delta\Delta$	1 621.532±95.640### $\Delta\Delta$

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，### $P<0.01$ ；与 TAK-242 组比较， $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

3.6 三十六荡坎蛤散对细胞 HMGB1、TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达的影响 与对照组比较，模型组细胞 HMGB1、TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，三十六荡坎蛤散组、TAK-242 组和三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞 HMGB1、TLR4、MyD88、

3.4 三十六荡坎蛤散对细胞上清液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响 与对照组比较，模型组细胞上清液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，三十六荡坎蛤散组、TAK-242 组和三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞上清液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)；与 TAK-242 组比较，三十六荡坎蛤散组细胞上清液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$)，三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞上清液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)，见表 6。

3.5 三十六荡坎蛤散对细胞上清液 HMGB1、NF- κ B 水平的影响 与对照组比较，模型组细胞上清液 HMGB1、NF- κ B 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，三十六荡坎蛤散组、TAK-242 组和三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞上清液 HMGB1、NF- κ B 水平降低 ($P<0.01$)；与 TAK-242 组比较，三十六荡坎蛤散组细胞上清液 HMGB1、NF- κ B 水平升高 ($P<0.01$)，三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞上清液 HMGB1、NF- κ B 水平降低 ($P<0.01$)，见表 7。

NF- κ B p65 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)；与 TAK-242 组比较，三十六荡坎蛤散组细胞 HMGB1、TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达降低 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)，见表 8。

表 8 三十六荡坎蛤散对细胞 HMGB1、TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	HMGB1	TLR4	MyD88	NF- κ B p65
对照组	1.004±0.133	1.003±0.097	1.003±0.075	1.005±0.101
模型组	3.158±0.530**	8.352±0.595**	4.149±0.315**	3.954±0.410**
三十六荡坎蛤散组	2.046±0.238### $\Delta\Delta$	2.678±0.315### $\Delta\Delta$	2.587±0.368### $\Delta\Delta$	2.120±0.193### $\Delta\Delta$
TAK-242 组	1.631±0.127###	1.975±0.246###	2.129±0.221###	1.681±0.290###
三十六荡坎蛤散+TAK-242 组	1.480±0.145###	1.534±0.087### $\Delta\Delta$	1.867±0.153### Δ	1.337±0.131### $\Delta\Delta$

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，### $P<0.01$ ；与 TAK-242 组比较， Δ $P<0.05$ ， $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

3.7 三十六荡坎蛤散对细胞 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达的影响 与对照组比较，模型组细胞 TLR4、MyD88 蛋白表达和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 比值升

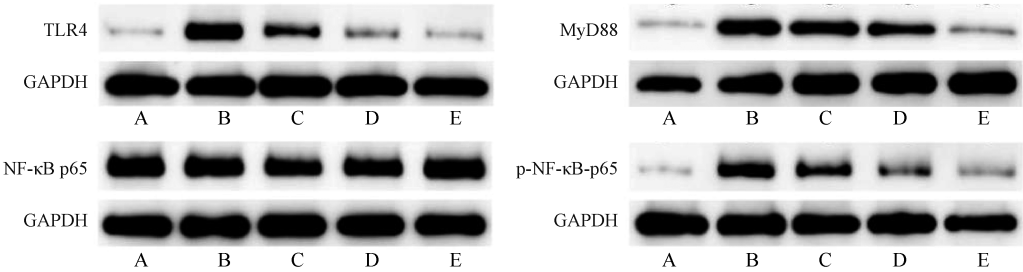
高 ($P<0.01$)；与模型组比较，三十六荡坎蛤散组、TAK-242 组和三十六荡坎蛤散+TAK-242 组细胞 TLR4、MyD88 蛋白表达和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 比值降低 ($P<0.01$)；与

TAK-242 组比较，三十六荡坎蛤散组细胞 MyD88 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，三十六荡坎蛤散+TAK-242 组 MyD88 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，见表 9、图 1。

表 9 三十六荡坎蛤散对细胞 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	TLR4	MyD88	p-NF-κB p65/NF-κB p65
对照组	0.056±0.036	0.126±0.021	0.129±0.018
模型组	0.620±0.131**	0.513±0.070**	0.780±0.244**
三十六荡坎蛤散组	0.297±0.042##	0.381±0.032##△	0.466±0.031##
TAK-242 组	0.186±0.059##	0.292±0.031##	0.309±0.035##
三十六荡坎蛤散+TAK-242 组	0.118±0.027##	0.190±0.010##△△	0.210±0.256##

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ ；与 TAK-242 组比较，△ $P<0.05$ ，△△ $P<0.01$ 。



注：A~E 分别为对照组、模型组、三十六荡坎蛤散组、TAK-242 组、三十六荡坎蛤散+TAK-242 组。

图 1 各组细胞 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白电泳图

4 讨论

哮喘是儿童常见的慢性气道炎症性疾病^[9]，如何控制临床症状，减少哮喘发作次数是哮喘治疗面临的困境之一。研究表明，中医药可以改善哮喘症状、提高机体免疫功能、减轻气道炎症^[10-11]。三十六荡坎蛤散是壮医治疗小儿哮喘临床经典方，由三十六荡、龙脷叶、一匹绸、石蚂蝗、坎气、蛤蚧组成，其中三十六荡作为主药能清扫毒邪障碍，畅通气道；龙脷叶可调气道，通谷道；一匹绸可除湿毒、调气道，化痰止咳；坎气能壮气道；蛤蚧可通水道以通气道，扶正补虚；石蚂蝗可通谷道以利气道畅通，调和诸药，共凑通调“气道”“谷道”，畅通“三道两路”，恢复“天、地、人”三气同步^[7]，具有扶正祛邪、调气解毒的功效，能有效缓解哮喘患儿的咳嗽症状，减少发作次数。

支气管上皮细胞是气道屏障细胞，是机体抵抗外来物质损伤的第一道天然防线^[12]，其细胞损伤是引起支气管哮喘气道炎症的始动因素，是哮喘重要的发病机制之一^[13]。当气道产生炎症时，损伤的支气管上皮周围会聚集大量中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞等炎症细胞并相互作用分泌释放 IL-6，诸多研究揭示了 IL-6 作为哮喘相关途径中的关键细胞信号传导模式，并可能作为哮喘的生物标志物发挥作用^[14-15]。IL-10 是一种公认的抗炎细胞因子，由巨噬细胞、单核细胞、T 淋巴细胞等多种免疫细胞生成，在抑制炎症性疾病和免疫性疾病方面具有重要的作用^[16]。气道上皮细胞是 HMGB1 分泌的潜在重要来源，主要定位于细胞核和细胞质中。研究已证实 HMGB1 作为经典促炎介质，其自身或协调内外源性分子都能诱导炎症反应，对气道上皮屏障产生破坏^[17]。TLR4 是 HMGB1 的重要受体，HMGB1/TLR4 途径可激活 HMGB1，导致一系列炎症反应和细胞损伤^[18-20]。MyD88 是气道上皮细胞炎症的负性调节因子，在

气道上皮细胞功能中发挥重要作用，研究发现 HMGB1 与 TLR2、TLR4 受体的结合依赖于 MyD88，进而激活 IKK 复合物，释放 NF-κB 进行核易位，最终引发炎症反应^[21]。

本研究中以低、中、高剂量三十六荡坎蛤散含药血清干预 BEAS-2B 细胞，发现其对抗炎因子 IL-10 水平和促炎因子 IL-6 水平均有影响，且以中剂量含药血清逆转 IL-10、IL-6 水平最佳，故基于此进行后续研究，发现与对照组比较，模型组细胞存活率下降，细胞凋亡率升高，IL-1β、IL-6、TNF-α 水平升高，而用三十六荡坎蛤散含药血清和抑制剂干预后可提升 HMGB1 诱导条件下支气管上皮细胞的增殖能力，抑制 HMGB1 所诱导的细胞凋亡及炎症细胞因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 分泌。这些结果表明三十六荡坎蛤散具有改善支气管上皮细胞炎症损伤和凋亡的作用。

进一步研究发现，与对照组比较，模型组细胞 NF-κB p65、TLR4、MyD88 mRNA 和蛋白表达及 p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值升高，而三十六荡坎蛤散干预后 NF-κB p65、TLR4、MyD88 mRNA 和蛋白表达及 p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值降低，说明 NF-κB 作为炎症介质参与支气管上皮细胞炎症反应的过程，且三十六荡坎蛤散能抑制 NF-κB 从细胞浆中被转位到细胞核内，从而纠正 NF-κB 的异常激活，并可通过降低 MyD88、TLR4 mRNA 和蛋白表达来改善支气管上皮细胞的炎症损伤病理状态。

综上所述，HMGB1 刺激 BEAS-2B 细胞释放 HMGB1 和 NF-κB 炎症介质，细胞中 TLR4、MyD88 和核内 NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达升高，三十六荡坎蛤散干预后，上述 mRNA 和蛋白表达降低，尤其是三十六荡坎蛤散联合 TLR4 抑制剂 TAK-242 降低上述炎症介质、基因和蛋白表达更为显著，说明两者具有良好的协同性，协同抑制支气管上皮细胞各炎症因子的合成和分泌，具有改善 HMGB1 诱导支气

管哮喘条件下的支气管上皮细胞损伤和炎症反应的作用,其作用机制可能与 HMGB1/TLR4/MyD88 信号通路密切相关。

参考文献:

[1] Hammad H, Lambrecht B N. The basic immunology of asthma[J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1469-1485.

[2] Koefoed H J L, Vonk J M, Koppelman G H. Predicting the course of asthma from childhood until early adulthood[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2022, 22(2): 115-122.

[3] 洪建国. 我国儿童哮喘诊治现状和思考[J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2021, 52(5): 725-728.

[4] Meng Z Y, Chen H Z, Deng C J, *et al.* Potential cellular endocrinology mechanisms underlying the effects of Chinese herbal medicine therapy on asthma [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 916328.

[5] 张合雷, 蔡 萱, 靳培培, 等. 中医药治疗支气管哮喘的研究进展[J]. *西部中医药*, 2021, 34(12): 155-158.

[6] 李伟伟, 庞宇舟. 壮医内儿科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018; 9-10; 35-37.

[7] 李伟伟, 雍亚云, 赵美莉, 等. 壮药三十六荡坎蛤散治疗小儿哮喘慢性持续期的机理探析[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(10): 54-55.

[8] 梁 悦, 薛艳龙, 杨超勉, 等. 高迁移率族蛋白 B1 对人支气管上皮细胞的炎症因子和受体表达的影响[J]. *中国医药科学*, 2022, 12(22): 4-7.

[9] 太 然, 袁振华, 姜妍琳, 等. 基于《证治汇补·哮喘》探析儿童哮喘防治思路[J]. *世界中医药*, 2024, 19(14): 2175-2179.

[10] 杨 涵, 闫永煌, 张文婷, 等. 中医药调节免疫平衡治疗咳嗽变异性哮喘研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(5): 206-212.

[11] 中国中西医结合学会呼吸病专业委员会. 支气管哮喘中西医结合诊疗中国专家共识[J]. *中国中西医结合杂志*,

2023, 43(1): 12-20.

[12] Chakraborty A, Mastalerz M, Ansari M, *et al.* Emerging roles of airway epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Cells*, 2022, 11(6): 1050.

[13] Abomalaka R. Bronchial epithelial and airway smooth muscle cell interactions in health and disease[J]. *Heliyon*, 2023, 9 (9): e19976.

[14] Pan R L, Kuai S G, Li Q Q, *et al.* Diagnostic value of IL-6 for patients with asthma: a meta-analysis[J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2023, 19(1): 39.

[15] Jevnikar Z, Östling J, Ax E, *et al.* Epithelial IL-6 trans-signaling defines a new asthma phenotype with increased airway inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143 (2): 577-590.

[16] Carlini V, Noonan D M, Abdalalem E, *et al.* The multifaceted nature of IL-10; regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1161067.

[17] Colavita L, Ciprandi G, Salpietro A, *et al.* HMGB1: A pleiotropic activity [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2020, 31: 63-65.

[18] Yang Q N, Li M, Hou Y J, *et al.* High-mobility group box 1 emerges as a therapeutic target for asthma[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11(12): e1124.

[19] 乔俊英, 宋 丽, 张艳丽, 等. 哮喘小鼠 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路及维生素 D 的作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(1): 95-103.

[20] 王思婷, 张 玥, 程志新, 等. 抵当汤对高速泳动族蛋白 B1/Toll 样受体 4/核因子 κB 通路的调控作用[J]. *世界中医药*, 2024, 19(16): 2404-2412.

[21] Kianian F, Kadkhodae M, Sadeghipour H R, *et al.* An overview of high-mobility group box 1, a potent pro-inflammatory cytokine in asthma[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2020, 31(6): 20190363.